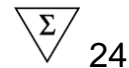


Manual *therascreen*[®] KRAS Pyro[®] Kit



Versiunea 1



Pentru utilizare in diagnosticul in vitro



971460



1061825RO



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,

GERMANIA

R3

MAT

1061825RO



Tehnologii QIAGEN de testare si prelevare de probe

QIAGEN este principalul furnizor de tehnologii inovatoare pentru testare si prelevare de probe, permitand izolarea si detectarea continuturilor oricarei mostre biologice. Produsele si serviciile noastre avansate, de inalta calitate, asigura succesul de la prelevarea probei pana la obtinerea rezultatului .

QIAGEN stabileste standardele in:

- Purificarea ADN-ului ,ARN-ului si a proteinelor
- Prelevarea de probe de acid nucleic si proteine
- Cercetare microARN si ARNi
- Automatizarea tehnologiilor de prelevare de mostre si probe

Misiunea noastra este de a va permite obtinerea unor succese si progrese remarcabile. Pentru mai multe informatii, vizitati site-ul www.qiagen.com.

Continut

Scopul utilizarii	5
Rezumat si explicatii	5
Principiu procedurii	6
Materiale asigurate	8
Continutul kitului	8
Materiale necesare dar nefurnizate	10
Avertismente si Precautii	11
Informatii de securitate	11
Precautii generale	12
Depozitarea si manipularea reactivilor	13
Depozitarea si manipularea probelor	13
Procedeu	14
Izolarea ADNului	14
Protocolul 1: Setariile pentru analiza pe Sistemul PyroMark Q24	16
Protocolul 2: PCR folosind reactivii pentru PCR din Kit-ul <i>therascreen</i> KRAS Pyro	18
Protocolul 3: Imobilizarea produselor PCR pe bilele de Streptavidin Sepharose de Inalta Performanta	21
Protocolul 4: Pregatirea probelor inainte de analiza de Pyrosecventiere pe PyroMark Q24	23
Protocolul 5: Functionarea PyroMark Q24	27
Protocolul 6: Analiza unei testari pe PyroMark Q24	29
Interpretarea rezultatelor	32
Interpretarea rezultatelor analizelor și detectare mutatiilor de nivel scazut.	32
Ghidul cu instructiuni de remediere a defectiunilor	36
Controlul de calitate	38
Limitarea utilizarii produsului	38
Caracteristici de performanta	40
Limita de blank si limita de detectie	40
Linearitatea	42
Precizia intermediara	42
Evaluarea diagnosticului	43

Referinte	44
Simboluri	45
Informatii contact	45
Anexa A: Setarea testarii <i>therascreen</i> KRAS Pyro	46
Anexa B: Golirea compartimentului si jgheaburilor pentru deseuri	49
Informatii pentru comanda	50

Scopul utilizarii

therascreen KRAS Pyro Kit este un test in vitro de detectare pe baza secventelor de acizi nucleici, bazat pe tehnologia Pyrosequencing[®], pentru detectarea de mutații cantitative în codonilor 12, 13, și 61 ale genei umane KRAS în ADN-ul genomic provenite din probe de țesuturi umane.

therascreen KRAS Pyro Kit-ul este destinat a fi folosit ca un ajutor pentru a identifica pacienții cu cancer colorectal mai susceptibile să beneficieze de terapii anti-EGFR, cum ar fi panitumumab și cetuximab. Pentru diagnostic in vitro.

Pentru utilizare numai pe Sistemul Q24 PyroMark. Sistemul PyroMark Q24 include următoarele:

- Aparatul PyroMark Q24 și aparatul PyroMark Q24 MDx
- PyroMark Q24 Vacuum Station și PyroMark Q24 MDx Vacuum Station
- Soft-ul PyroMark Q24 (versiunea 2.0) și Soft-ul PyroMark Q24 MDx (versiunea 2.0)

Produsul este destinat utilizării de către profesioniști, cum ar fi tehnicieni și medici, care sunt instruiți în procedurile de diagnostic in vitro, tehnicile biologiei moleculare și pe sistemul PyroMark Q24.

Rezumat și explicații

Există un puternic accent pe analiza mutației KRAS în Europa datorită condițiilor Comisiei Europene de acordare a autorizației de introducere pe piață pentru panitumumab și cetuximab pentru tratamentul cancerului de colon metastaza la pacienții cu gena KRAS nonmutated (de tip sălbatic). Aceasta înseamnă că panitumumab și cetuximab pot fi administrate numai la pacienții care au fost scanati pentru statutul de mutația KRAS.

Kitul *therascreen* KRAS PyroMar cu marcajul CE-IVD este pentru măsurătorile cantitative ale mutațiilor în codonii 12, 13 și 61 ai genei KRAS la om. Produsul se compune din două teste: unul pentru detectarea mutațiilor în codonii 12 și 13 și al doilea pentru detectarea mutațiilor în codonul 61 (Figura 1). Cele două zone sunt amplificate separat de PCR și ordonate prin regiunea definită. Secvențele care înconjoară pozițiile definite servesc ca varfuri de normalizare și de referință pentru cuantificarea și evaluarea calității analizei.

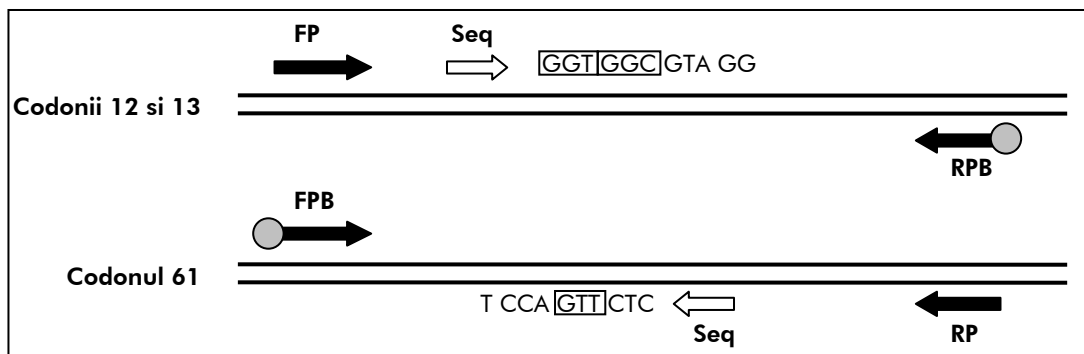


Figura 1. Imaginea testului KRAS. Ordinea indicata este ordinea analizata pentru o proba de tip salbatic. **FP** si **FPB**: primeri PCR care inainteaza (B indica biotinilarea); **RP** si **RPB**: primeri PCR care se intorc (B indica biotinilarea); **Seq**: primeri de ordonare (secventiere).

Nota: Codonii 12 si 13 sunt ordonati in directia forward si codonul 61 este ordonat in directia reverse.

Produsul consta dintr-un primer mix PCR si un primer de secventiere pentru fiecare test. Primerii sunt livrati in solutie. Fiecare flacon contine 24 µl din fiecare primer sau primer mix.

Principiu procedurii

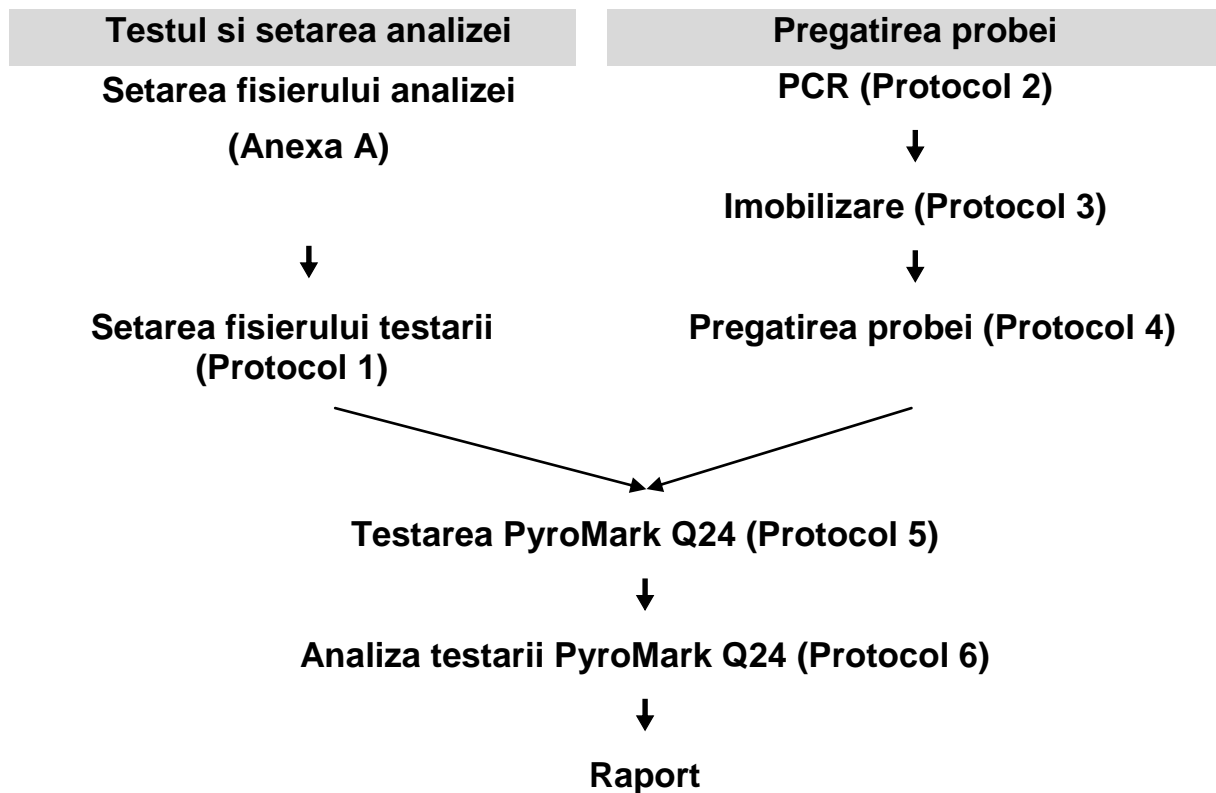
Fluxul de lucru ilustreaza procedura de testare. Dupa ce PCR a folosit primerii ce vizeaza codonii 12/13 si codonului 61, ampliconii sunt imobilizati pe siragurile de Streptavidin Sepharose de inalta performanta. ADN-ul monocatenar este preparat si primerii de secventiere corespunzatori revin la ADN. Probele sunt apoi analizate pe Sistemul PyroMark Q24 folosind un fisier de configurare ("run setup") si un fisier de "run".

Se recomanda folosirea Raportului KRAS Plug-in pentru interpretarea analizei. Raportul KRAS Plug-in poate fi obtinut pe e-mail la adresa pyro.plugin@qiagen.com.

Cu toate acestea, interpretarea analizei se poate face folosind instrumentul de analiză parte integrantă a Sistemului PyroMark Q24. "Secventa de analizat" poate fi reglata pentru detectia unei mutatii rare dupa analiza (vezi "Protocolul 6: Analiza unei testari pe PyroMark Q24", pagina 29).

Nota: Fluxul de lucru a fost usor modificat fata de manualul kit-ului PyroMark KRAS si revizuirea R1 a manualului kit-ului *therascreen* KRAS Pyro (ase vedea "Protocolul 2: PCR folosind reactivii pentru PCR din Kit-ul *therascreen* KRAS Pyro" pagina 18 si "Protocolul 4: Pregatirea probelor inainte de analiza de Pyrosecventiere pe PyroMark Q24" pagina 23.

Fluxul de lucru pentru protocolul therascreen KRAS Pyro



Controale

Controlul nemetilat al ADN-ului este inclus în kit ca un control pozitiv pentru PCR și reacțiile de secvențiere. Acest control are un genotip salbatic în regiunile secvențiate folosind acest kit și este necesară pentru obținerea unor rezultate adecvate și identificarea mutațiilor de nivel scăzut (a se vedea “Interpretarea rezultatelor”, pagina 32). A se include câte o probă cu un control nemetilat de ADN pentru fiecare testare din fiecare serie de Pyrosecvențiere.

În plus, un control negativ (fără matrită ADN) trebuie să fie inclus în fiecare configurație PCR pentru cel puțin o testare.


Materiale asigurate

Continutul kitului

therascreen KRAS Pyro Kit (cutia 1/2)

<i>therascreen</i> KRAS Pyro Kit	(24)
Nr. catalog.	971460
Numar de reactii	24
Seq Primer KRAS 12/13	24 µl
Seq Primer KRAS 61	24 µl
PCR Primer KRAS 12/13	24 µl
PCR Primer KRAS 61	24 µl
PyroMark [®] PCR Master Mix, 2x	850 µl
CoralLoad [®] Concentrate, 10x	1.2 ml
H ₂ O	3 x 1.9 ml
Unmethylated Control DNA, 10 ng/µl	100 µl

therascreen buffere si reactivi (cutia 2/2)

therascreen buffere si reactivi		
PyroMark Binding Buffer		10 ml
PyroMark Annealing Buffer		10 ml
PyroMark Denaturation Solution*		250 ml
PyroMark Wash Buffer, 10x		25 ml
Enzyme Mixture		1 vial
Substrate Mixture		1 vial
dATP \square S		1180 μ l
dCTP		1180 μ l
dGTP		1180 μ l
dTTP		1180 μ l
Manual		1

* Contine hidroxid de sodium.

Materiale necesare dar nefurnizate

Cand se lucreaza cu substante chimice, intotdeauna trebuie sa purtati un halat de laborator, manusi de unica folosinta si ochelari de protectie. Pentru mai multe informatii, consultați fișele cu date de securitate (SDS), care pot fi procurate de la furnizorul produsului.

- Kitul de izolare a ADN-ului (vezi “Izolarea ADNului”, pag. 14)
 - Pipete (reglabile)*
 - Varfuri sterile pentru pipeta (cu filtru pentru PCR)
 - Microcentrifuga*
 - Thermo cycler* si tuburi PCR corespunzatoare
 - Streptavidin Sepharose™ de inalta performanta (GE Healthcare, cat. Nr. 17-5113-01, www.gelifesciences.com).
 - PyroMark Q24 (nr. cat. 9001513 sau 9001514)*†
 - PyroMark Q24 Soft (nr.cat. 9019063 sau 9019062)†
 - PyroMark Q24 Placi (nr.cat. 979301)†
 - PyroMark Q24 Cartus (nr.cat. 979302)†
 - PyroMark Q24 Vacuum Workstation (cat. no. 9001515 or 9001517)*†
 - Mixer * pentru placi, pentru imobilizarea pe bile
 - Bloc termic* capabil sa atinga 80°C
 - Placa de PCR cu 24 de godeuri sau strip-uri
 - Capace pentru strip-uri
 - Apa de inalta puritate (Milli-Q® 18.2 MΩ x cm sau echivalent).
- Nota:** Este furnizata suficienta apa in kit pentru pentru PCR, imobilizarea ADN-ului si pentru a dizolva Amestecul de enzime și Substratul pentru amestec, si de asemenea. Este necesara o cantitate de apa de înaltă puritate pentru a dilua solutia tampon de PyroMark, 10x
- Ethanol (70%) ‡

* Asigurati-va ca instrumentele au fost verificate si calibrate conform recomandarilor producatorului.

† Cele marcate cu CE-IVD in conformitate cu directiva EU 98/79/CE. Toate celelalte produse listate nu sunt marcate cu CE-IVD, pe baza Directivei EU 98/79/CE.

‡ Nu folositi alcool denaturat, care conține alte substanțe, cum ar fi metanol sau metiletlicetonă.

Mixere recomandate pentru placi

Mixerele pentru placi afisate in Tabelul 1 sunt recomandate pentru folosirea cu kit-ul theascreen KRAS Pyro

Tabel1. Mixerele pentru placi recomandate pentru folosirea cu kit-ul theascreen KRAS Pyro

Producator	Produs	Numar catalog
Eppendorf	Thermomixer comfort (Basic device)	5355 000.011
	Thermoblock for MTP	5363 000.012
	Adaptor pentru placi de 96 x 0.2 ml tuburi PCR pentru a le introduce in blocuri	5363 007.009
H+P Labortechnik GmbH	Variomag [®] Teleshake	51410 (115 V = 51410 U)
	Variomag Monoshake	51110 (115 V = 51110 U)

Avertismente si Precautii

Pentru folosirea la diagnosticul in vitro

Informatii de securitate

Atunci cand se lucreaza cu substante chimice, trebuie sa purtati intotdeauna un halat de laborator, manusi de unica folosinta si ochelari de protectie. Pentru mai multe informatii, va rugam consultati fisele tehnice de securitate (SDS-uri). Acestea sunt disponibile online intr-un format PDF convenabil si compact de pe site-ul www.qiagen.com/safety, unde puteti gasi, vedea si tipari SDS-urile pentru fiecare kit QIAGEN si fiecare componenta de kit.

Urmatoarele fraze de risc si siguranta se aplica lcomponentelor kit-ului *therascreen* KRAS Pyro.

PyroMark Denaturation Solution



Atenție! Provoacă iritarea pielii. Provoacă o iritare gravă a ochilor. Poate fi corosiv pentru metale. Absorbiți scurgerile de produs, pentru a nu afecta materialele din apropiere. Păstrați numai în recipientul original. Purtați mănuși de protecție/ îmbrăcăminte de protecție/ echipament de protecție a ochilor/ echipament de protecție a feței.

PyroMark Enzyme Mixture



Conține: (R*,R*)-1,4-Dimercaptobutane-2,3-diol; acetic acid. Pericol! Provoacă iritarea pielii. Provoacă leziuni oculare grave. ÎN CAZ DE CONTACT CU OCHII: clătiți cu atenție cu apă timp de mai multe minute. Scoateți lentilele de contact, dacă este cazul și dacă acest lucru se poate face cu ușurință. Continuați să clătiți. In caz de expunere demonstrată sau presupusă: Se va anunța un CENTRU pentru OTRAVIRI sau un doctor. Se vor scoate hainele contaminate și se vor spăla înainte de re folosire. Purtați mănuși de protecție/ îmbrăcăminte de protecție/ echipament de protecție a ochilor/ echipament de protecție a feței.

PyroMark Substrate Mixture



Conține: acetic acid. Atenție! Provoacă iritarea pielii. Provoacă o iritare gravă a ochilor. Dacă iritarea ochilor persistă: consultați medicul. Se vor scoate hainele contaminate și se vor spăla înainte de re folosire. Purtați mănuși de protecție/ îmbrăcăminte de protecție/ echipament de protecție a ochilor/ echipament de protecție a feței.

Precautii generale

Nota: Utilizatorul trebuie sa acorde intotdeauna atentie urmatoarelor:

- Conformitate stricta cu manualul de utilizare este necesară pentru rezultate optime. Dilutia reactivilor, altele decât cele descrise în acest manual, nu sunt recomandate, avand ca rezultat o pierdere a performanței.
- Fluxul de lucru a fost usor modificat (a se vedea “Protocolul 2: PCR folosind reactivii pentru PCR din Kit-ul *therascreen* KRAS Pyro” pagina 18 si “Protocolul 4: Pregatirea probelor inainte de analiza de Pyrosecventiere

pe PyroMark Q24” pagina 23, fata de manualul kit-ului PyroMark KRAS si revizuirea R1 a manualului kit-ului *therascreen* KRAS Pyro

- Componentele din kit sunt suficiente pentru 24 de reactivi in 5 run-uri independente.
- Folosirea varfurilor de pipeta sterile, cu filtru (pentru PCR).
- Prelevarea si depozitarea materialele pozitive (mostre de proba, martori pozitivi si ampliconi) separat de toti ceilalti reactivi, si adaugarea la amestecul de reactie dintr-o unitate separata spatial.
- Inainte de inceperea unui test, toate componentele vor fi lasate sa se dezghete bine la temperatura camerei (15-25°C).
- Cand sunt dezghetate, componentele se amesteca (prin pipetare rapida in sus si in jos si prin vortexare) si se centrifugheaza scurt.
- Rezultatele esuate nu reprezinta o baza pentru evaluarea statusului mutational.

Depozitarea si manipularea reactivilor

Kitul *therascreen* KRAS Pyro se transporta in doua cutii. Kitul *therascreen* KRAS Pyro (cutia 1/2) pe gheata carbonica. PyroMark[®] PCR Master Mix, CoralLoad[®] Concentrate, Unmethylated Control DNA si, toti primerii trebuiesc depozitati la primire între -30°C și -15°C.

therascreen Pyro Buffers si Reactivii (cutia 2/2) contine *therascreen* bufferele, amestecurile de enzime , amestecul de substrat, dATP α , dCTP si dTTP (reactivii pentru analiza de Pirosecventiere) sunt transportate in cutii termoizolante, racite. Aceste component trebuiesc depozitate la primire la temp. de 2-8°C. Pentru scaderea pierderii activitatii se recomanda tinerea enzimelor si substrate mixture in fiolele furnizate.

Enzimele reconstituite si amestecul de substrat sunt stabile pentru cel putin 10 zile la 2-8°C. Enzimele reconstituite si Substrate mixture pot fi congelate si depozitate între -30°C și -15°C in fiolele lor. Reactivii congelati nu trebuiesc supusi la mai mult de 3 cicluri de congelare-decongelare.

Nota: Nucleotidele nu trebuiesc congelate.

Kitul *therascreen* KRAS Pyro este valabil pana la data inscrisa pe ambalaj daca este depozitat in aceste conditii.

Depozitarea si manipularea probelor

Toate probele trebuiesc tratate ca material potential infectios.

Materialul probelor este ADN uman extras din sange sau probe incastrate in parafina, fixate in formol (FFPE).

Nu trebuie folosite probe umane din timpul unui tratament cu heparina. Probele de sange care au fost colectate in eprubete si care contin heparina ca anticoagulant, nu vor fi folosite. Heparina afecteaza PCR.

Procedeu

Izolarea ADNului

Performanța sistemului a fost stabilita cu ajutorul kit-ului EZ1[®] DNA Tissue Kit și QIAamp[®] DNA FFPE Tissue Kit pentru extragerea de ADN uman din probele tumorale fixate cu formol si parafinate. Pentru sistemul QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit, performanța a fost stabilită prin utilizarea de probe de la donatori de sânge sanatosi parțial intesate cu celule tumorale.

Kiturile de la QIAGEN[®] prezentate in Tabelul 2 sunt recomandate pentru purificarea ADN-ului din tipurile de probe de la om indicate pentru utilizarea cu kitul theascreen KRAS Pyro Kit. Purificarea ADN-ului se face in conformitate cu instructiunile din manualul kitului.

Tabelul 2. Kiturile de purificare a ADN-ului recomandate pentru utilizarea cu kitul *therascreen* KRAS Pyro Kit

Materialul probei	Kit de izolare a acidului nucleic	Numar catalog (QIAGEN)
Tesut incastrat in parafina	QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404
	EZ1 DNA Tissue Kit (48)*	953034
Sange	QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit [†]	61104

* * Se respecta protocolul pentru utilizarea cu tesut incastrat in parafina. Kitul pentru ADN din tesut EZ1 va fi folosit in combinatie cu Cardul Advanced EZ1 (cat.nr. 9018298), cu Cardul Advanced EZ1 al Sectiunii cu Parafina pentru ADN (cat.nr. 9018298), cu Cardul Advanced XL EZ1 (cat.nr. 9001492 sau 9001493) si Cardul EZ1 Advanced XL al Sectiunii cu parafina pentru ADN (cat. Nr. 9018700) sau cu BioRobot EZ1 (cat.nr. 9000705; nu mai este disponibil) si cardul EZ1 pentru ADN al Sectiunii cu parafina pentru ADN (cat. Nr. 9015862).

[†] Marcajul CE IVD este in conformitate cu directiva UE 98/79/CE .

Protocolul 1: Setariile pentru analiza pe Sistemul PyroMark Q24

Punct important inainte de pornire

- Daca se cere, LOB poate fi confirmat prin folosirea unei probe de tip salbatic pentru a genera o placa plina de rezultate. Pentru detalii consultati ghidul CLSI Guideline EP17-A "Protocol pentru determinarea limitelor de detectare si a limitelor de cuantificare; ghid aprobat".

Ce trebuie facut inainte de pornire

- În cazul în care Report-ul KRAS Plug-in nu a fost instalat, creați Setarile Metodei (a se vedea Anexa A, pagina 46). Acest lucru trebuie făcut numai o dată, înainte de a rula *therascreen* KRAS testul Pyro pentru prima dată (a se vedea Anexa A, pagina 46). In cazul in care Report-ul KRAS Plug-in a fost instalat, Setarile Metodei sunt disponibile în browser-ul de comenzi rapide din soft-ul PyroMark Q24, în "Fișiere exemplu/ Setari PyroMark/ KRAS". Raportul KRAS Plug-in se poate obtine pe e-mail de la adresa pyro.plugin@qiagen.com.

Protocol

1. Se da click meniul toolbar.

Este creat un nou fisier pentru testare.

Se introduce parametrii testarii (vezi “

2. Parametrii testarii”, pagina 17).

3. Se pregateste placa prin adaugare de probe pentru ambii codoni 12/13 si codonul 61 in godeurile care corespund probelor pentru analiza.

Nota: Un control de proba negativ (fara matrita ADN) trebuie inclus in fiecare setare PCR pentru cel putin o testare.

Nota: Se include o proba cu ADN control nemetilat pentru fiecare analiza din fiecare testare de Pirosecventiere (a se vedea “Controale”, pagina 7).

4. Cand testarea este pregatita si gata de derulare pe PyroMark Q24: se tipareste o lista cu volumele cerute de amestec de enzime, amestec de substraturi si nucleotide si setarile placii. Selectati “Pre Run Information” din meniul “Tools” si cand apare raportul, dati click pe .

5. Inchideti fisierul de analiza si copiati-l pe un stick USB (oferit impreuna cu sistemul) folosind programul Windows® Explorer.

Nota: Informatia tiparita Pre Run poate fi folosita ca model pentru pregatirea testarii (vezi "Protocolul 3: Imobilizarea produselor PCR pe bilele de Streptavidin Sepharose de Inalta Performanta", pag. 21).

Pentru analiza placii pe sistemul PyroMark Q24, vezi "Protocolul 5: Functionarea PyroMark Q24", pag. 27.

Parametrii testarii

Denumirea testarii:	Denumirea testarii este data cand fisierul este salvat. Redenumirea fisierului schimba si denumirea testarii.
Metoda de lucru:	Selectati metoda de lucru in conformitate cu tipul cartusului care se vor folosi pentru derularea testarii. Vezi instructiunile oferite impreuna cu produsele.
ID-ul placii:	Optional: se introduce ID-ul placii PyroMark Q24.
Cod de bare:	Optional: se introduce codul de bare pentru placa sau daca aveti un cititor de cod de bare conectat la computerul dvs, se pune cursorul mouse-ului in text box-ul « Barcode » (se da click pe box) si se scaneaza codul de bare.
ID-ul Kit-ului:	Optional: se introduce numarul lotului pentru <i>therascreen</i> KRAS Pyro Q24 care trebuie folosit. Numarul lotului poate fi gasit pe eticheta produsului. Nota: Recomandam introducerea ID-ului reactivului cat si a kit-ului astfel incat orice fel de probleme neprevazute cu reactivii sa poata fi urmarite.
Nota testarii:	Optional: introduceti o nota privind continuturile sau scopul testarii.

Adaugarea fisierelor testarii.

Pentru a adauga o proba intr-un godeu puteti face urmatoarele:

- Dati click dreapta pe godeu si selectati "Load Assay" [incarcare proba] din meniul contextului.
- Selectati proba in browserul de shortcut, dati click si trageți proba spre godeu.

Un godeu are cod de culori conform probei incarcate in godeu.

Introducerea ID-urilor si notelor pentru probe

Pentru a introduce un ID sau nota a probei, selectati celula si introduceti textul.

Pentru a edita un ID sau nota a probei, selectati celula (continutul afisat va fi selectat) sau dati dublu click pe celula.

Protocolul 2: PCR folosind reactivii pentru PCR din Kit-ul *therascreen* KRAS Pyro

Acest protocol este pentru amplificările PCR ale unei zone ce conține codonul 12 și codonul 13, și o amplificare PCR separată a unei zone ce conține codonul 61, folosind kitul *therascreen* KRAS Pyro.

Puncte importante înainte de începere

- Fluxul de lucru a fost ușor modificat comparative cu manualul kit-ului *PyroMark KRAS* (etapa 5)
- Polimeraza HotStarTaq DNA din mix-ul *PyroMark Master Mix* necesită o etapă de activare de **15 minute la 95°C**.
- Setati toate amestecurile de reacție într-o zonă separată de cea folosită pentru purificarea ADN, adăugând template ADN la PCR, analiza produsului PCR sau prepararea probelor înainte de analiza de Pyrosecvențiere.
- Folositi varfuri de unică folosință care contin filtre hidrofobe, pentru a minimaliza contaminarea încrucișată.

Ce trebuie făcut înainte de începere

- Înainte de deschiderea tuburilor cu primeri PCR, se centrifughează scurt pentru a colecta conținutul pe fundul tuburilor.
- Dacă este cazul, reglați concentrația ADN-ului din proba sau control, la 0,4-2 ng/.

Protocol

1. Se dezgheata toti reactivii necesari (a se vedea Tabelul 3).

Amestecați bine înainte de folosire.

2. Se prepara un amestec de reacție pentru fiecare primer conform Tabelului 3.

Amestecul de reacție conține în mod tipic, toate componentele necesare pentru PCR, cu excepția probei.

Se prepara un volum de amestec de reacție mai mare decât cel cerut pentru numărul total de testări PCR ce trebuie efectuate.

Tabelul 3. Pregatirea amestecului de reactive pentru fiecare primer PCR

Componente	Volum/reactive(μl)
PyroMark PCR Master Mix, 2x	12.5
CoralLoad Concentrate, 10x	2.5
PCR Primer KRAS 12/13 sau PCR Primer KRAS 61	1.0
Apa (H ₂ O furnizata)	4.0
Volum total	20.0

3. Se amesteca bine amestecul de reactie si se distribuie 20 μ l in fiecare tub PCR

Nu este neceara pastrarea tuburilor PCR pe gheata, deoarece HotStarTaq DNA polimeraza este inactiva la temperatura camerei.

4. Se adauga 5 μ l de ADN template (2-10 ng de ADN genomic) in tuburile individuale PCR (vezi tabelul 4) si se amesteca foarte bine.

Nota: Un control de proba negativ (fara matrita ADN) trebuie inclus in fiecare setare PCR pentru cel putin o testare.

Nota: Se include o proba cu ADN control nemetilat pentru fiecare analiza din fiecare testare de Pirosecventiere (a se vedea "Controale", pagina 7).

Tabelul 4. Pregatirea PCR-ului

Componente	Volum/reactie (μl)
Amestec de reactie	20
Proba de ADN	5
Volum total	25

5. Programarea termo-cycler-ului conform instructiunilor producatorului, folosind conditiile subliniate in Tabelul 5.

Tabelul 5. Protocol optimizat de cycling

			Comentarii
Etapa de activare initiala:	15 minute	95°C	HotStarTaq ADN polimeraza este activata de aceasta etapa de incalzire.
Cycling in 3 etape:			
Denaturarea	20 secunde	95°C	
Alinierea	30 secunde	53°C	
Extensia	20 secunde	72°C	
Numarul de cicluri	42		
Extensia finala:	5 minute	72°C	

6. Amplasarea tuburilor PCR in termo cycler si pornirea programului de cycling.

7. Dupa amplificare, se va continua cu "Protocolul 3: Imobilizarea produselor PCR pe bilele de Streptavidin Sepharose de Inalta Performanta", pagina 21.

Protocolul 3: Imobilizarea produselor PCR pe bilele de Streptavidin Sepharose de Inalta Performanta

Acest protocol este pentru imobilizarea ADN-ului template pe Streptavidin Sepharose de Inalta Performanta (GE Healthcare) inainte de analiza efectuata pe sistemul PyroMark Q24.

Ce trebuie facut inainte de pornire

- Inainte de pornire permiteti tuturor reactivilor si solutiilor cerute sa atinga temperatura ambientala (15-25°C).

Protocol

1. Agitati usor sticla ce contine Streptavidin Sepharose de Inalta Performanta, pana cand se obtine o solutie omogena.
2. Preparati un amestec master pentru imobilizarea ADN-ului in conformitate cu Tabelul 6. Preparati un volum cu 10% mai mare decat cel cerut pentru numarul total de reactii ce trebuie efectuate.

Tabelul 6. Master mix pentru imobilizarea ADN

Componenta	Volum/proba(μl)
Streptavidin Sepharose High Performance	2
PyroMark Binding Buffer	40
Apa (H ₂ O furnizata)	28
Volum total	70

3. Se adauga 70 μl din amestecul master in godeurile unei placi PCR cu 24 de godeuri sau pe strip-uri, asa cum se arata in setarile testarii (vezi "Protocolul 1: Setariile pentru analiza pe Sistemul PyroMark Q24", pagina 16).
4. Se adauga 10 μl de produs PCR biotinitat din Protocolul 2, in fiecare godeu care contine amestec master asa cum s-a predefinit in setarea testarii "Protocolul 1: Setariile pentru analiza pe Sistemul PyroMark Q24", pagina 16).
Nota: Volumul total per godeu trebuie sa fie de 80 μl dupa adaugarea amestecului master si a produsului PCR.
5. Se etanseaza placa PCR (sau strip-urile) prin folosirea capacelor pentru strip-uri.
Nota: Asigurati-va ca nu sunt posibile pierderi printre godeuri.

- 6. Agitati placa PCR la temperatura camerei (15-25°C) timp de 5-10 minute la 1400 rpm.**

Nota: In timpul acestei etape, pregatiti statia de lucru in vid PyroMark Q24 Vacuum Workstation pentru prepararea probelor, asa cum se descrie in Manualul Utilizatorului PyroMark Q24.

- 7. Treceti imediat la “Protocolul 4: Pregatirea probelor inainte de analiza de Pyrosecventiere pe PyroMark Q24”, page 23.**

Nota: Bilele de Sepharose sedimenteaza rapid. Captarea (prinderea) bilelor trebuie sa aiba loc imediat dupa agitare.

Protocolul 4: Pregatirea probelor inainte de analiza de Pyrosecventiere pe PyroMark Q24

Acest protocol este pentru pregatirea unui ADN monocatenar si alinierea primerului de secventiere la template inainte de analiza de pyrosecventiere pe PyroMark Q24.

Puncte importante inainte de incepere

- Inaintea deschiderii tuburilor cu primeri de secventiere se centrifugheaza scurt pentru a colecta continutul pe fundul tuburilor
- Se adauga 2 primeri de secventiere diferiti in acelasi tipar asa cum a fost predefinit pentru placa, in setarile pentru testare "Protocolul 1: Setariile pentru analiza pe Sistemul PyroMark Q24", pagina 16), in functie de zona analizei (codonii 12 si 13, sau codonul 61).
- Fluxul de lucru a fost usor modificat fata de revizia R1 a manualului kit-ului de theascreen *KRAS Pyro* (pasul 18). A nu se mica timpul de racire a probei dupa incalzirea la 80°C.
- Efectuarea testului pentru sondele de filtrare asa cum este descris în Manualul de utilizare al PyroMark Q24 în mod regulat și efectuat schimbul sondelor cu filtru atunci cand este indicat.

Lucruri de facut inainte de a începe

- Se aseaza suportul placii PyroMark Q24 pe un bloc termic incalzit la 80°C pentru utilizare in etapa 17. Se lasa al doilea suport pentru placa PyroMark Q24 la temperatura camerei (15-25°C) pentru a se folosi in etapa 18.
- PyroMark Wash Buffer este furnizat sub forma deconcentrat 10x. Inainte de folosirea pentru prima data, se dilueaza pana la solutie de lucru 1x prin adaugarea de 225 ml apa de puritate inalta la 25 ml 10x PyroMark Wash Buffer (volum final de 250 ml).

Nota: 1x PyroMark Wash Buffer, Solutia de lucru, este stabile la 2-8°C pana la data de expirare inscriptionata.

Protocolul

- 1. Se dilueaza o cantitate suficienta din fiecare primer de secventiere, Seq Primer KRAS 12/13 si Seq Primer KRAS 61, in solutia tampon de aliniere PyroMark, asa cum se arata in tabelul 7.**

Se prepara o cantitate de primer diluat, mai mare decat cea ceruta pentru numarul total de probe care trebuie secventiate (pentru numarul de probe + una in plus).

Tabelul 7. Exemplu de diluare a primerilor de secventiere

Componenta	Volum/proba (µl)	Volumul pentru 9 + 1 reactii(µl)
Seq Primer KRAS 12/13 sau	0.8	8
Seq Primer KRAS 61		
PyroMark Annealing Buffer	24.2	242
Volum total	25	250

2. **Se adauga 25 µl de primer de secventiere diluat in fiecare godeu de pe placa PyroMark Q24 in conformitate cu setarile testarii “Protocolul 1: Setariile pentru analiza pe Sistemul PyroMark Q24, pagina 16.**

Nota: Mentineti unul din suportii placutei PyroMark Q24 (livrat impreuna cu Statia de lucru in vid PyroMark Q24 Vacuum) la temperatura camerei (15-25°C), si folositi-l ca suport atunci cand pregatiti si deplasati placa.

3. **Asezati pe masa de lucru placa PCR (sau strip-ul) din Protocolul 3 si Placa PyroMark Q24 (Figura 2).**

Nota: Asigurati-va ca placa este orientata in aceeasi directie ca si atunci cand au fost incarcate probele.

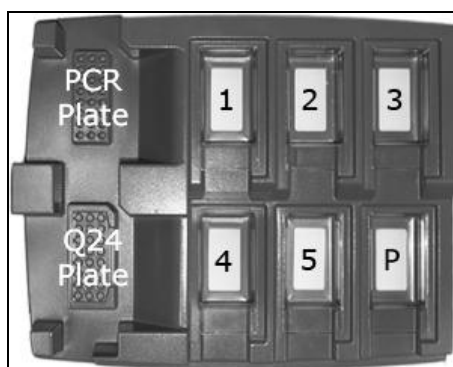


Figura 2. Amplasarea placii PCR (sau strip-urilor) si placii PyroMark Q24 pe statia de lucru in vid

4. **Aplicati vid asupra instrumentului prin deschiderea butonului pentru vid.**
5. **Coborati cu grija sondele cu filtru de la instrumentul de vacuum in placa PCR (sau strip) pentru a capta bilele ce contin template-urile immobilizate. Mentineti sondele timp de 15 secunde in acelasi loc. Aveti grija cand ridicati instrumentul de vacuum.**

Nota: Bilele de Sepharose sedimenteaza rapid. Capturarea bilelor trebuie sa se faca imediat dupa agitare.

Daca a trecut mai mult de 1 minut de la agitarea placii (sau strip-ului), agitati din nou timp de 1 minut inainte de captarea bilelor.

6. Transferati instrumentul de vacuum spre jgheabul care contine 40 ml 70% etanol (Figura 2). Clatiti sondele cu filtru timp de 5 secunde.
7. Transferati instrumentul spre jgheabul ce contine 40 ml Solutie de Denaturare (Figura 2). Clatiti sondele cu filtru timp de 5 secunde.
8. Transferati instrumentul spre jgheabul care contine 50 ml Solutie tampon de spalare (Figura 2). Clatiti sondele cu filtru timp de 10 secunde.
9. Ridicati instrumentul in sus si spre spate, dincolo de 90° vertical, timp de 5 secunde pentru a drena lichidul din sondele cu filtru (Figura 3).



Figura 3. Imaginea instrumentului de vid ridicat pe verticala dincolo de 90°.

10. In timp ce instrumentul de vacuum este tinut deasupra Placii PyroMark Q24, se inchide butonul de vid de pe instrument (Off).
11. Se elibereaza bilele in placa PyroMark Q24 ce contine primerii de secventiere prin agitarea usoara a instrumentului dintr-o parte in alta.
Nota: A nu se deteriora suprafata placutei de PyroMark Q24 prin zgarierea cu sonda cu filtru.
12. Se transfera instrumentul de vacuum deasupra jgheabului ce contine apa de inalta puritate (Figura 2) si se agita instrumentul timp de 10 secunde.
13. Spalati sondele cu filtru prin scufundare in apa puritate inalta (Figura 2) si prin aplicare de vid. Clatiti sondele cu 70 ml apa puritate inalta.
14. Ridicati instrumentul de vacuum in sus si spre spate, dincolo de 90° vertical, timp de 5 secunde pentru a drena lichidul din sondele cu filtru (Figura 3).
15. Inchideti butonul de vid de pe instrumentul de vacuum (Off) si asezati instrumentul in pozitia Parking (P).
16. Inchideti pompa de vid.

Nota: La sfarsitul unei zile de lucru, deseurile lichide si solutiile remase trebuie eliminate si statia de lucru PyroMark Q24 Vacuum Workstation trebuie controlata in privinta prafului si scurgerilor (vezi Anexa B, pagina 49).

- 17. Incalziti placa PyroMark Q24 cu probe la 80°C timp de 2 minute, folosind suportul de placa PyroMark Q24 preincalzit.**
- 18. Indepartati placa PyroMark Q24 de pe suportul fierbinte si transferati-le pe alt suport ce a fost tinut la temperatura camerei (15-25°C) si lasati probele sa se raceasca la temperatura camerei timp de 15 minute.**
- 19. Continuati cu “Protocolul 5: Functionarea PyroMark Q24”, pagina 27.**

Protocolul 5: Functionarea PyroMark Q24

Acest protocol descrie pregătirea și încărcarea reactivilor PyroMark Gold Q24 în cartusul PyroMark Q24 și începerea și terminarea unei testări pe PyroMark Q24. Pentru o descriere detaliată asupra setării unei testări se va consulta *Manualul Utilizatorului PyroMark Q24*.

Punct important înainte de pornire

- Raportul de informare Pre Run, găsit în meniul “Tools” la setarea testării (vezi “Protocolul 1: Setările pentru analiza pe Sistemul PyroMark Q24”, pagina 16) oferă informații despre volumul de nucleotide, enzime și soluție tampon substrat, necesare pentru un test specific.

De făcut înainte de pornire

- Se porneste PyroMark Q24. Butonul de pornire se află în partea din spate a instrumentului.

Procedura

- 1. Se dizolvă enzimele liofilizate și a substratului pentru amestecuri în 620 µl de apă fiecare (H₂O furnizată).**
- 2. Amestecați ușor prin rasucirea flaconului.**
Nota: Nu vortexați!
Nota: Pentru a vă asigura că amestecul este complet dizolvat, se lasă la temperatură camerei (15-25°C) timp de 5-10 minute. Înainte de umplerea cartuselor de PyroMark Q24, asigurați-vă că Soluția nu este tulbură. În cazul în care nu folosiți reactivi imediat, plasati flacoanele cu reactivi în gheata* sau la frigider.
- 3. Lasati reactivi și cartusele de PyroMark Q24 să ajungă la temperatură camerei (15-25°C).**
- 4. Așezați cartusul de PyroMark Q24 cu eticheta spre dumneavoastră.**
- 5. Încărcați cartusul PyroMark Q24 cu volumele corespunzătoare de nucleotide, enzime și substratul pentru amestecuri, conform Figurii 4.**
Asigurați-vă că nu sunt transferate bule de aer din pipeta în cartus.

* Când se lucrează cu substanțe chimice, purtați întotdeauna halat, măști de unică folosință și ochelari de protecție. Pentru mai multe informații, consultați fișele de siguranță adecvate (SDSs), furnizate de către producător.

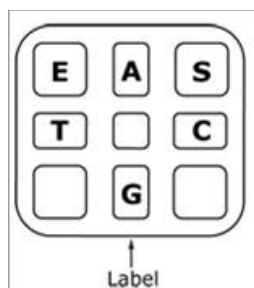


Figura 4. Reprezentarea cartuselor de PyroMark Q24 vazute de sus. Adnotarile corespund etichetelor de pe flacoanele de reactivi. Se adauga amestecul de enzime (E), amestecul de substrat (S), si nucleotidele (A,T,C,G), in functie de informatiile despre volum date in raportul Pre Run ce se regaseste in menu-ul “Tools” de la setarile testarii.

6. **Deschideți usa cartușului și introduceți cartușul pentru reactivi umplut cu eticheta spre exterior. Împingeți cartușul în întregime și apoi împingeți-l în jos.**
7. **Asigurați-va ca linia este vizibilă în partea frontală a cartușului și închideți usa.**
8. **Deschideți cadrul de susținere a placutei și așezați placuta pe blocul termic.**
9. **Inchideți cadrul de susținere a placutei și capacul instrumentului.**
10. **Introduceți stickul USB (care conține fișierul de testare) în portul USB din partea frontală a instrumentului.**
Nota: Nu scoateți stick-ul USB înainte ca testarea să se fi încheiat.
11. **Selectați “Run” din meniul principal (folosind tastele ▲ și ▼ de pe ecran).**
12. **Selectați fișierul pentru testare folosind tastele ▲ și ▼ de pe ecran.**
Nota: Pentru a vedea conținutul unui folder, selectați folderul și apăsați “Select”. Pentru revenire la imaginea anterioară, apăsați “Back”.
13. **Când fișierul pentru testare este selectat, apăsați “Start” pentru a porni testarea.**
14. **Când testarea este încheiată și instrumentul confirmă faptul că fișierul pentru testare a fost salvat pe stickul USB, apăsați “Close”.**
15. **Scoateți stick-ul USB.**
16. **Deschideți capacul instrumentului.**
17. **Deschideți usa cartușului și scoateți cartușul pentru reactivi prin ridicare și tragere în afara.**
18. **Inchideți usa.**
19. **Deschideți cadrul de susținere al placii și scoateți placa de pe blocul termic.**
20. **Inchideți cadrul de susținere al placii și capacul instrumentului.**
21. **Se arunca placa și se curate cartușul conform instrucțiunilor din fișa de la livrarea cartușului.**

22. Analizati testarea conform cu “Protocolul 6: Analiza unei testari pe PyroMark Q24”, pagina 29.

Protocolul 6: Analiza unei testari pe PyroMark Q24

Acest protocol descrie analiza mutatiei la o testare KRAS terminata, folosind softul PyroMark Q24.

Protocol

- 1. Se introduce stickul USB care contine fisierul cu testarile procesate in portul USB al computerului.**
- 2. Mutati fisierul cu testarea de pe stickul USB in locul dorit din computer, folosind Windows Explorer.**
- 3. Deschideți fișierul cu testarea în modulul AQ al soft-ului PyroMark Q24, fie prin selectarea “Open” din meniul “File” sau prin dublu-clic pe fișierul (✓) în browser-ul de comenzi rapide.**
- 4. Exista doua metode pentru a analiza testarea. Daca se foloseste Report KRAS Plug, se trece la pasul 5. Daca se foloseste analiza cu AQ integrat in PyroMark Q24, se trece la pasul 6.**

Nota: recomandăm insistent să utilizați Raport-ul KRAS Plug-in pentru interpretarea rezultatelor. Raport-ul KRAS Plug-in se poate obtine pe e-mail la adresa pyro.plugin@qiagen.com. Acest raport ne asigură valorile LOD (Tabel 8) și diferite “Secvente de Analizat” sunt folosite automat pentru a detecta toate mutatiile.

5. Folosirea Report-ului KRAS Plug-in:

Pentru a genera un raport, selectati “AQ Add On Reports/KRAS” si “Codon 12 and 13” sau “Codon 61” din meniul “Reports”.

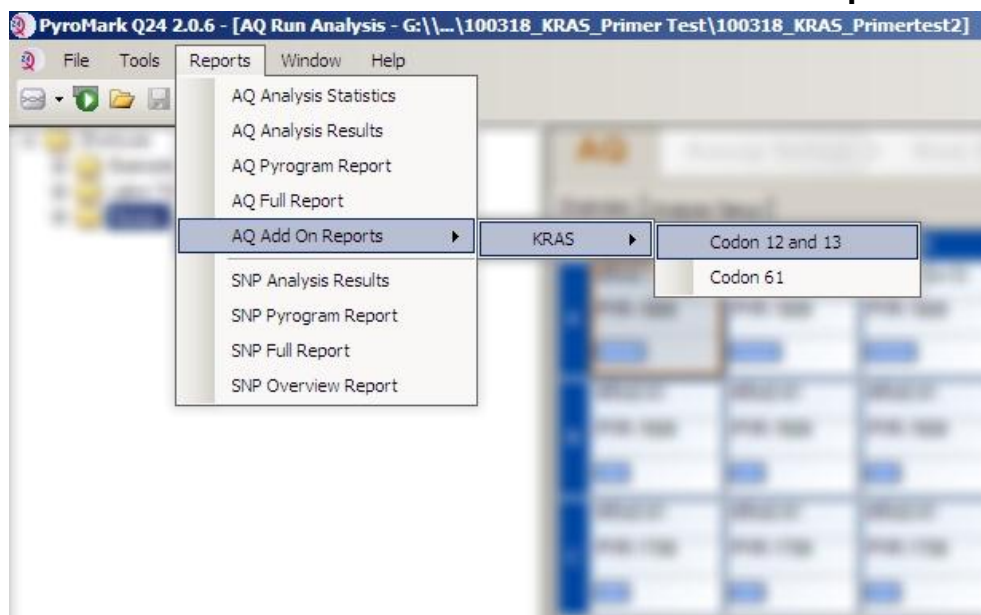


Figura 5. Ecranul cu analiza AQ.

Godeurile vor fi analizate automat pentru toate mutațiile pentru care LOD este prezentat în Tabelul 8. Rezultatele vor fi prezentate într-un tabel de ansamblu (Figura 6), urmate de rezultatele detaliate, inclusiv Pyrograms și analiza calității.

Summary

Well	Sample ID	Result	Frequency	Codon Change	Amino Acid Substitution	Info
A1	13	Wildtype				⚠
A2	14	Wildtype				
A3	15	Wildtype				
A4	16	Mutation (codon 12)	4,2 %	GGT>AGT	G12S	⚠
B2	18	Wildtype				
B3	19	Wildtype				
B4	20	Mutation (codon 12)	4,6 %	GGT>AGT	G12S	⚠
C1	21	Wildtype				
C2	22	Wildtype				
C3	38	Mutation (codon 12)	29,7 %	GGT>GAT	G12D	
C4	39	Mutation (codon 13)	42,5 %	GGC>GAC	G13D	

⚠ See detailed results for further explanation.

Figura 6. Tabelul rezumatului rezultatelor.

6. Folosirea analizei AQ:

Pentru a analiza testarea și pentru a obține o imagine de ansamblu a rezultatelor faceți clic pe unul din butonul Analize.



Analizarea tuturor godeurilor.



Analizarea godeurilor selectate.

Rezultatele analizelor (frecvența alelelor) și evaluarea calității sunt afișate deasupra poziției variabile pe traseul Pyrogram®. Pentru mai multe detalii despre cum se analizează o testare se va consulta *Manualul Utilizatorului PyroMark Q24*.

Pentru a genera un raport, selectați “AQ Full Report” sau “AQ Analysis Results” din meniul “Reports”.

Nota: Cele mai frecvente mutații în KRAS sunt găsite la nucleotida 35 (baza a doua a codonului 12). De aceea standardul “Secvența de analizat” pentru testarea Codonul 12 și 13 KRAS se adresează mutațiilor din această poziție (vezi Anexa A, pag. 46). Dacă o probă conține o mutație la nucleotida 34 (prima baza a codonului 12), “Secvența de analizat” poate fi schimbată pentru a analiza și starea de mutație în această poziție, așa cum se descrie în Anexa A. În mod similar, “Secvența de analizat” poate fi schimbată pentru testarea codonului KRAS 61, așa cum este descrisă în anexa A.

Frecventele actualizate ale mutatiilor in gena umana KRAS in codonii 12/13 si 61 sunt oferite online de Institutul Sanger pe site-ul www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

Nota: Pentru rezultate corecte recomandam ca inaltimea unui peak individual sa fie peste 30 RLU. 30 RLU ar trebui sa fie setat ca "inaltime de peak ceruta pentru indeplinirea calitatii" in setarea testarii (vezi Anexa A si Manualul Utilizatorului PyroMark Q24).

Nota: Raportul rezultatelor de la analiza AQ ar trebui folosite pentru documentarea si interpretarea cuantificarii alelice. Numerele afisate in Pyrogram sunt rotunjite si nu arata adevarata cuantificare.

Nota: Pyrogramul trebuie intotdeauna comparat cu histograma, acesta putand fi afisat prin click dreapta in fereastra Pyrogramului. Vârfurile măsurate trebuie să se potrivească cu înălțimea barelor din histogramă.

Reanalizarea probelor fara nici o mutatie detectata in nucleotida 35 (Codonul 12) sau 183 (Codonul 61) sau prin bifarea evaluarii calitatii "Check " si "Failed" ("Verificata" sau "Esuata").

Recomandăm insistent reanalizarea tuturor probelor cu nici o mutație detectate cu standardul "Sequence to Analyze", precum și probele care au primit un "Check" sau "Failed" la evaluarea calității. "Check" sau "Failed" la evaluarea calității pot indica o mutație într-o altă poziție decât nucleotide 35 sau 183, rezultând în devieri ale înaltimii peak-ului la referință. De exemplu, un peak în oricare dintre primele 3 dispensari arată ca o mutatie este prezent la nucleotida 34.

Pentru a reanaliza si tinti mutatiile la nucleotida 34, mergeti la "Analysis Setup" si modificati "Sequence to Analyze" din *GNTGRCGTAGGC* in *NGTGRCGTAGGC*. Apasati butonul "Apply" si dati click pe "To All" cand apare fereastra "Apply Analysis Setup".

Pentru a reanaliza si tinti mutatiile la nucleotida 182 (pozitia a doua din Codonul 61), schimbati "Sequence to Analyze" a testarii Codonului 61 la secventa urmatoare.

CTCTHGACCTG

Pentru a reanaliza si tinti mutatiile la nucleotida 181 (prima pozitie din Codonul 61), schimbati "Sequence to Analyze" a testarii Codonului 61 la secventa urmatoare.

CTCTTSACCTG

Nota: Dupa schimbarea "Secventei de analizat", asigurați-vă că pragul pentru înălțimea unui peak individual este setat la 30 de RLU.

Nota: In cazul în care vârfurile măsurate nu se potrivesc cu înălțimea barelor din histogramă și nu pot fi explicate prin mutații rare sau neașteptate, rezultatul nu reprezinta o baza pentru interpretarea statusului mutational. Este recomandat să testati din nou proba.

Interpretarea rezultatelor

Interpretarea rezultatelor analizelor și detectare mutațiilor de nivel scăzut.

Recomandam insistent ca pentru comparație și pentru controlul nivelurilor de fond, să fie inclusă în fiecare testare un control ADN nemetilat. Frecvența măsurată a probei de control trebuie să fie mai mică sau egală cu limita de martor (LOB).

Toate probele trebuie examinate în relație cu limita de detectie (LOD, vezi Tabelul 8) și interpretate după cum urmează:

- Frecvența mutației < LOD: Tip sălbatic
- Frecvența mutației \geq LOD și \leq LOD +3 unități: Potentiale mutații de nivel scăzut.

Nota: Dacă se folosește Plug-in Report (etapa 5 din “Protocolul 6: Analiza unei testări pe PyroMark Q24”, pagina 29) și se întâmplă aceasta, va fi emis un avertisment.

Probele cu un potențial raportat de mutații de nivel scăzut ar trebui să fie considerate pozitive pentru mutație, dacă sunt confirmate de către testarea din nou, în două exemplare, împreună cu un control ADN nemetilat. Rezultatul ambelor duplicate trebuie să fie \geq LOD și diferit de proba de control. În caz contrar, proba trebuie să fie judecată ca tip sălbatic.

- Frecvența mutației > LOD + 3% unități: Mutație.

În cazul folosirii Raportului KRAS Plug-in, aceasta se generează automat.

Nota: Se recomandă folosirea Raportului KRAS Plug-in pentru interpretarea rezultatelor. Pentru o examinare mai amănunțită a probelor cu un potențial raportat de mutații de nivel scăzut, noi recomandăm analiza manuală, suplimentară în soft-ul aplicației (de exemplu, pentru compararea cu frecvența mutației a probei de control).

Nota: O frecvență măsurată peste LOB în proba de control indică un nivel mai mare decât cel obișnuit al fondului din testarea respectivă, ce ar putea avea un impact în cuantificarea alelică, în special pentru mutațiile de nivel scăzut. În acest caz, frecvențe măsurate în intervalul de la LOD (Tabelul 8) la LOD +3 % unități nu sunt o bază pentru a se pronunța statusul mutațional. Se recomandă retestarea probelor cu un potențial mutațional scăzut.

Nota: Algoritmul Raportului KRAS Plug-in a fost folosit pentru generarea datelor LOB și LOD. Analiza manuală folosind soft-ul aplicației PyroMark în modul descris în Protocolul 6 (pagina 29), poate genera valori ușor diferite.

Nota: Decizia unui tratament in cazul pacientilor bolnavi de cancer nu trebuie sa se bazeze exclusiv pe statusul mutational KRAS.

Tabel 8. LOB si LOD determinate pentru mutatii specifice

Acid nucleic substituit	Aminoacid substituit	LOB (% units)	LOD (% units)	COSMIC ID* (V42)
Codon 12 (GGT)				
GAT	G12D	0.6	2.2	521
GTT	G12V	0.0	1.0 (7) [†]	520
TGT	G12C	0.5	2.1	516
AGT	G12S	0.4	1.9	517
GCT	G12A	0.7	2.3	522
CGT	G12R	0.3	1.8	518
Codon 13 (GGC)				
GAC	G13D	0.3	1.9	532
Codon 61 (CAA), testat in orientarea (TTG)				
GTG	Q61H	0.8	2.8	554
TAG	Q61L	1.2	3.1	553
TCG	Q61R	1.6	3.5	552
ATG	Q61H	0.7	2.6	555
TTC	Q61E	1.2	3.1	550

* Din Catalogul Mutatiilor Somatice in Cancer, disponibil online de la Institutul Sanger pe www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

[†] Cel mai scăzut nivel de mutație într-o probă constand într-o frecvența măsurată \geq LOD.

Rezultate reprezentative folosind analiza AQ integrate sistemului PyroMark Q24

Rezultate reprezentative ale Pirogramei sunt aratate in Figurile 7–11.

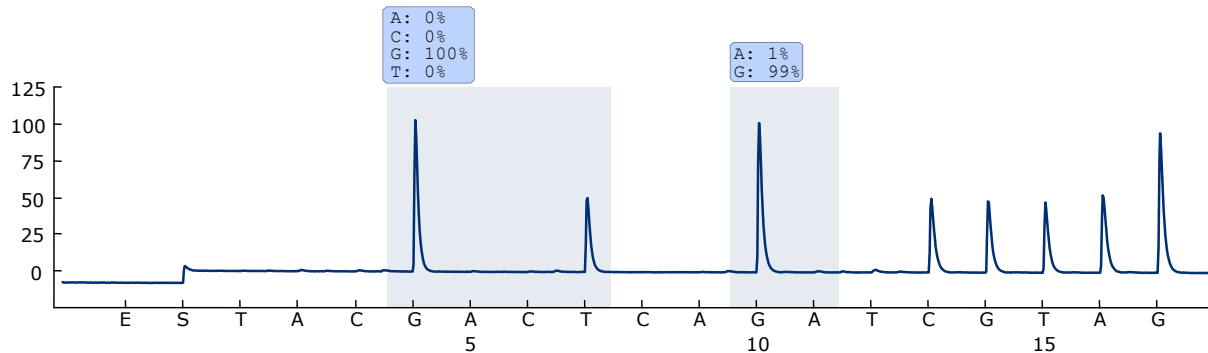


Figura 7. Traseul Pirogramei obtinut dupa analiza unei probe cu un genotip salbatic in codonii 12 si 13.

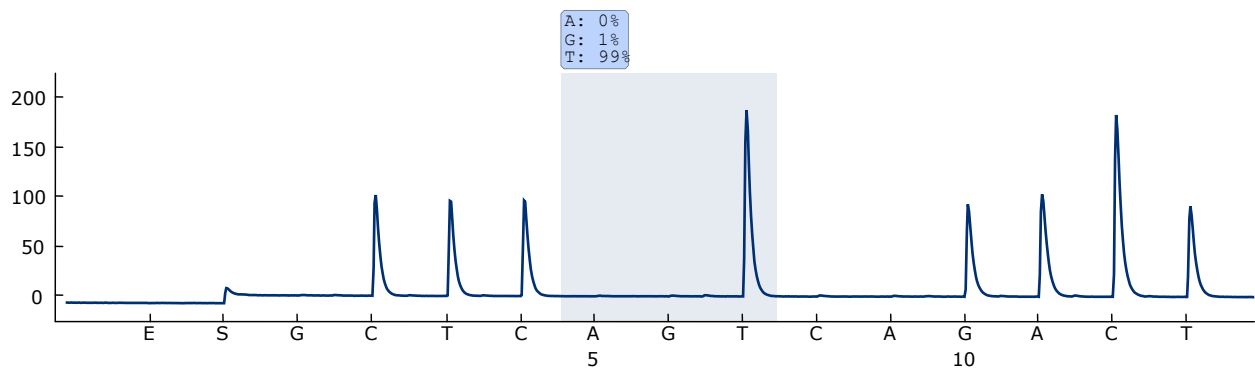


Figura 8. Traseul Pirogramei obtinut dupa analiza unei probe cu un genotip salbatic in codonul 61.

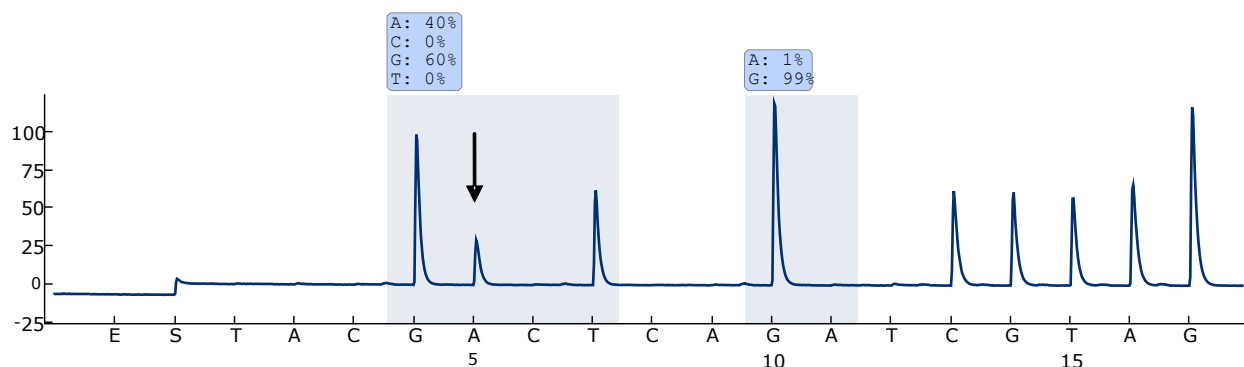


Figure 9. Traseul Pirogramei obtinut dupa analiza probelor cu o mutatie GGT → GAT in baza 2 a codonului 12 (nucleotida 35, indicata cu o sageata).

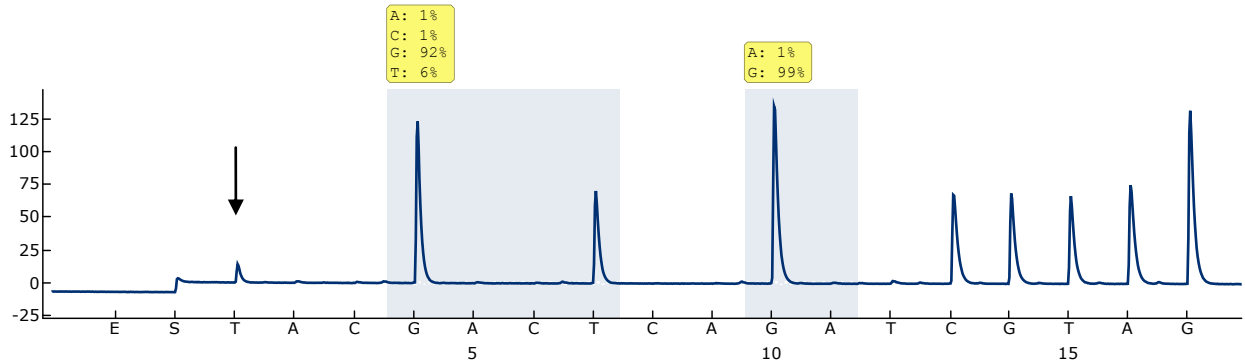


Figura 10. Traseul pirogramei obtinut dupa analiza probelor cu o mutatie GGT → TGT in baza 1 a codonului 12 (nucleotida 34, indicata cu o sageata) cu “Sequence to analyze” GNTGRCGTAGGC indicand baza 2 din codonul 12 (nucleotida 35). Culoarea galbena indica faptul ca aceasta secventa este neprevazuta si trebuie verificata.

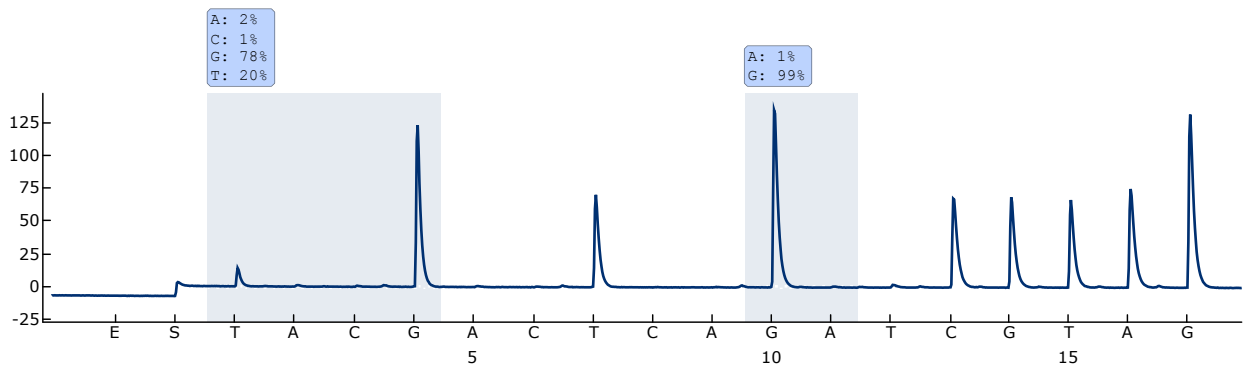


Figure 11. Traseul pyrogramei si rezultatele obtinute dupa reanaliza probei in Fig.10. Mutatia GGT → TGT a fost reanalizata cu “Sequence to Analyze” NGTGRCGTAGGC tintind baza 1 in codonul 12 (nucleotida 34).

Ghidul cu instructiuni de remediere a defectiunilor

Acest ghid poate fi util in solutionarea oricaror probleme ce pot aparea. Pentru mai multe informatii vedeti si pagina cu Intrebari Adresate Frecvent din cadrul Centrului de Suport Tehnic: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Oamenii de stiinta de la QIAGEN Technical Services [Servicii Tehnice QIAGEN] sunt intotdeauna gata sa va raspunda cu placere la orice fel de intrebari despre informatiile si protocoalele din acest manual sau despre tehnologiile de testare si prelevare de probe (pentru informatii de contact, vezi de asemenea coperta din spate sau vizitati www.qiagen.com).

Nota: Pentru remedierea defectiunilor instrumentului consultati Manualul Utilizatorului PyroMark Q24.

Comentarii si sugestii

Semnale la nivelul template-ului de control (control negative)

- | | |
|---------------------------------|--|
| a) Intermodulatie intre godeuri | Semnalul de la un godeu este detectat in godeul vecin. Evitati asezarea de probe cu intensitati ridicate de semnal langa godeurile ce contin controalele negative. |
| b) Contaminare PCR | Folositi pipete cu varfuri sterile. Recoltati si depozitati materiale cum ar fi specimene, controale ampliconii separat de reactivii de PCR. |

Secvente slabe sau neprevazute

- | | |
|---------------------------------------|---|
| a) Calitatea slaba a ADN-ului genomic | ADN-ul genomic de slaba calitate poate cauza esuarea PCR. Analiza PCR a probelor folosind o tehnica de electroforeza (folosirea sistemul QIAxcel® sau electroforeza in gel de agaroză). |
|---------------------------------------|---|

Comentarii si sugestii

“Check” sau “failed” rezultate

- a) Peak de inaltime joasa Erorilor de setare a PCR-ului sau in prepararea probelor înainte de Pyrosecventiere poate duce la peak-uri joase. Este recomandata reanalizarea probei. Se efectueaza testele pentru sondele cu filtru cum sunt descrise in manualul PyroMark Q24 si se schimba sondele cu filtru cand se indica.
- In cazul in care apare avertismentul ”Check”, se compara cu atentie Pyrograma cu histograma prin click dreapta in fereastra Pyctogramei. Daca inaltimea masurata a peak-urilor se potriveste cu inaltimea barilor histogramei, rezultatul este valid. Altfel, se recomanda reanaliza probei.
- b) Mutatii nedefinite in
 “Secventa de analizat” Reglati secventa de analizat din setarile testarii (vezi Anexa A, pagina 46) si reanalizati testarea.
- c) Mutatii rare
 neprevazute In evaluarea calitatii “Check” sau “Failed” pot fi cauzate de un tipar al varfurilor neprevazut. Acest lucru ar putea indica o mutatie neasteptată, care nu este analizată de raportul plug-in. Aceasta proba ar trebui analizata manual folosind Soft-ul PyroMark Q24 si tinand cont de mutatiile neprevazute.
- d) O deviere mare in
 inaltimea varfurilor
 attentionand o
 distribuire Pyrograma trebuie comparata foarte atent cu histograma, prin click dreapta in fereastra Pyctogramei. Daca inaltimea masurata a peak-urilor nu se potriveste cu inaltimea barilor histogramei, si nu poate fi explicata prin mutatiile rare, se recomanda reanaliza probei.

Background ridicat

- a) Depozitare incorecta a
 nucleotidelor -A se depozita nucleotidele la 2–8°C. Depozitarea la –15 to –30°C poate determina o crestere a background-ului.

Comentarii si sugestii

- | | |
|--|---|
| b) Timp redus de racire a probei inainte de analiza de Pyrosecventiere | Păstrați probele pe un suport de placă PyroMark Q24, la temperatura camerei timp de 10-15 minute. Nu reduceti timpul de răcire. |
| c) Contaminarea cartusului | Curățați cu atenție cartușul așa cum este descris în fișa produsului. Depozitați cartușul protejat de lumină și praf. |

Lipsa semnalului pentru controlul pozitiv (Unmethylated Control DNA)

- | | |
|---|--|
| a) Enzima insuficienta sau amestec de substrat pentru toate godeurile | Asigurați-vă că umpleți cartusul PyroMark Q24 în conformitate cu "Informații Pre Run" din meniul "Tools". |
| b) Reactivi depozitati sau diluati incorect | Pregătiți reactivii PyroMark Q24 Gold în conformitate cu instrucțiunile furnizate cu reactivii. |
| c) Activarea insuficienta a AND polimerazei HotStarTaq | ADN-polimeraza HotStarTaq din Master Mix-ul PCR PyroMark necesită o etapa de activare de 15 minute la 95°C. |
| d) PCR-ul sau pregatirea probei insuficiente | Rezolvarea erorilor de setare a PCR-ului, setarea ciclului de PCR sau in prepararea probelor înainte de Pyrosecventiere poate duce lipsa semnalului. Se efectueaza testele pentru sondele cu filtru cum sunt descrise in Manualul PyroMark Q24 si se schimba sondele cu filtru cand se indica. Se repeat PCR-ul si analiza de Pyrosecventiere. |

Controlul de calitate

In conformitate cu Sistemul de Management al Calitatii al QIAGEN, certificat ISO, fiecare lot de kit-uri *therascreen* KRAS PyroMark este testat pentru specificatiile prestabilite pentru asigurarea calitatii consistente a produsului.

Limitarea utilizarii produsului

Rezultatele produsului trebuie interpretate in cadrul contextului tuturor rezultatelor clinice si de laborator, relevante.

Este responsabilitatea utilizatorului de a valida performanțele sistemului pentru oricare din procedurile utilizate în laboratorul lor care nu sunt acoperite de studiile de performanță Qiagen.

Caracteristici de performanta

Limita de blank si limita de detectie

Limita de blank (LOB) si limita de detectie (LOD) au fost determinate pentru un numar de mutatii folosind amestecurile de plasmide (Tabel 9.). LOB si LOD au fost determinate conform recomandarilor din :Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Guideline EP17-A “Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline” (Protocolul pentru determinarea limitelor de detectie si a limitelor de cuantificare ; ghid aprobat. Erorile α si β (fals pozitiv, respectiv fals negativ) au fost stabilite la 5%.

Valorile LOB reprezintă frecvența măsurată obținută pe o proba de tip sălbatic. Valorile LOD reprezintă semnalul cel mai mic (frecvența măsurată), care pot fi considerate pozitive pentru mutația respectivă.

Mutatia GGT→GTT in codonul 12

Pentru aceasta mutatie, masurarile pentru martor au fost constant de 0% unitati (n=72), rezultand o distributie non-Gaussian. LOD, prin urmare, a fost determinată folosind o metodă diferită, în conformitate cu recomandările din CLSI Guideline EP17-A. Cel mai mic semnal care indică prezența unei mutații (LOD), în această poziție a fost stabilit la unitatea de 1%, care este în mod clar deasupra nivelului de bază a unității (LOB) de 0%. Cel mai scăzut semnal care indica prezența unei mutații în această poziție a fost stabilit la unitatea de 1% care este în mod clar peste nivelul de bază al unității 0%. Când se analizează o proba cu un nivel al mutației de 7% , 95% din rezultate (n=89) a dat un semnal care putea fi considerat pozitiv (\geq LOD, i.e. ≥ 1 % unit).

Tabelul 9. Determinarea LOB si LOD pentru mutatiile specific.

Acid nucleic substituit	Aminoacid substituit	LOB (% unitati)	LOD (% unitati)	COSMIC ID* (V42)
Codon 12 (GGT)				
GAT	G12D	0.6	2.2	521
GTT	G12V	0.0	1.0 (7) [†]	520
TGT	G12C	0.5	2.1	516
AGT	G12S	0.4	1.9	517
GCT	G12A	0.7	2.3	522
CGT	G12R	0.3	1.8	518
Codon 13 (GGC)				
GAC	G13D	0.3	1.9	532
Codonul 61 (CAA), asa cum a fost testat in orientarea reverse (TTG)				
GTG	Q61H	0.8	2.8	554
TAG	Q61L	1.2	3.1	553
TCG	Q61R	1.6	3.5	552
ATG	Q61H	0.7	2.6	555
TTC	Q61E	1.2	3.1	550

* Din Catalogul Mutatiilor Somatice in Cancer, disponibil online de la Institutul Sanger pe www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

[†] Cel mai scăzut nivel de mutație într-o probă constand într-o frecvența măsurată \geq LOD.

Nota: Aceste valori s-au bazat pe analizele in care plasmidele purtatoare ale tipului salbatic sau secventelor mutante au fost folosite pentru amplificarea PCR.

Nota: Algoritmul Report “KRAS Plug-in” a fost folosit pentru generarea datelor LOB si LOD. Analiza manuala folosind aplicatia din Soft-ul KRAS PyroMark Q24, cum este descrisa în Protocolul 6 (pagina 29) poate avea ca rezultat valori ușor diferite .

Nota: Se recomanda ca performanta metodei sa fie confirmata in laborator.

Linearitatea

Linearitatea a fost masurata in conformitate cu documentul EP6-A al Institutului pentru Standarde Clinice si de Laborator "Evaluarea linearitatii procedeeelor de masurari cantitative: o abordare statistica; ghid aprobat"

Plasmidele purtatoare ale tipului salbatic si cele mutante au fost amestecate in proportii care sa dea urmatoarele niveluri de mutatie: 0; 12,5; 25; 37,5 si 50%. Patru dubluri ale amestecurilor au fost puse intr-un tipar aleatoriu pe o placa si au fost analizate. Rezultatele pentru mutatia GGT → TGT in codonul 12 au fost analizate folosind Softul Analyse-it® v2.04 (Softul Analyse-it, Ltd., Marea Britanie) si sunt prezentate in Figura 12.

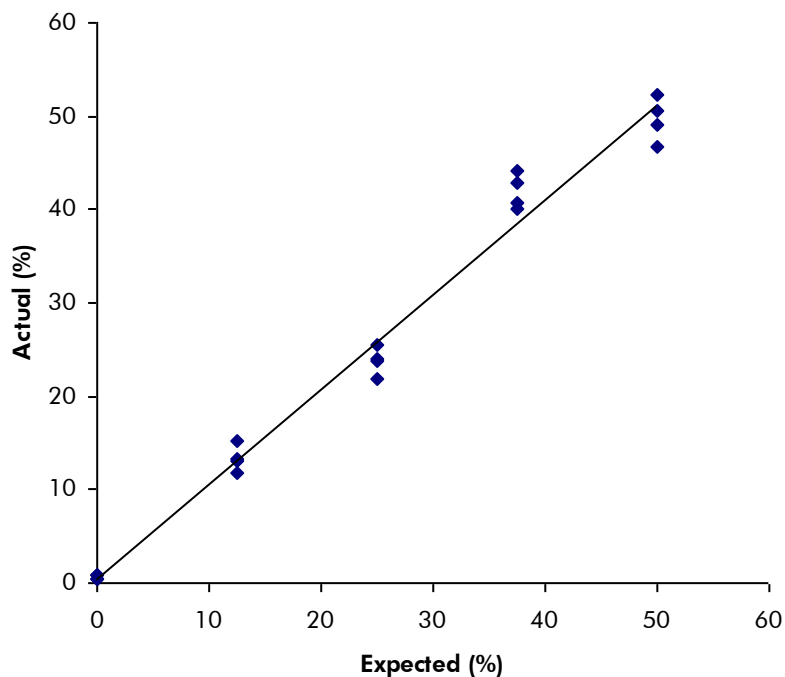


Figura 12. Linearitatea mutatiei GGT → TGT in codonul 12

Repetabilitatea generala a fost de 1.64% unitati si rezultatele au fost lineare in cadrul unei nonlinearitati permise de 3% unitati. Rezultate similare au fost obtinute pentru mutatia GGC → GAC in codonul 13.

Precizia intermediara

Determinarea linearitatii mutatiei GGT → TGT in codonul 12 a fost repetata de 3 operatori in 3 zile diferite, folosind diferite combinatii de reactivi cu PyroMark Q24. Rezultatele celor 3 incercari sunt prezentate in Tabelul 12, pagina 44.

Tabelul 11. Precizia intermediara

% plasmide mutante [†]	Test 1		Test 2		Test 3		Rezumat	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
0.0	0.6	0.2	1.7	0.7	0.7	0.2	1.0	0.6
12.5	13.3	1.5	16.2	1.9	14.6	3.0	14.7	1.4
25.0	23.8	1.4	26.8	2.4	26.9	2.9	25.8	1.8
37.5	42.0	1.9	41.7	0.5	38.5	2.6	40.7	2.0
50.0	49.7	2.4	50.5	1.8	49.1	4.8	49.8	0.7

*Toate valorile sunt date in % unitati. SD: deviere standard.

[†] Pe baza masuratorilor OD₂₆₀

Valorile pentru imprecizia intermediara (SD) au fost 0.6-2.0% unitati in intervalul masurat de 0-50%.

Evaluarea diagnosticului

Kitul *therascreen* KRAS PyroMark a fost evaluat comparativ cu DxS KRAS Mutation Kit. ADN-ul a fost extras dintr-un numar de 100 probe din tumori potential cancerigene fixate cu formol si parafinate (FFPE) și analizate pentru mutații în codonii 12 și 13.

ADN-ul pentru testare a fost izolat folosind kitul EZ1 DNA Tissue Kit si analiza a fost efectuata cu kitul *therascreen* KRAS PyroMark pe PyroMark Q24 si cu kitul DxS KRAS Mutation Kit pe ABI PRISM[®] 7900HT SDS.

Din cele 100 de probe analizate, starea mutationala a putut fi determinata in 91 esantioane cu kitul DxS KRAS Mutation Kit. Cu kit-ul *therascreen* KRAS Pyro Kit a fost posibila determinarea starii mutationale pentru 94 de probe.

Excluzand probele care nu au reusit cu unul sau ambele kituri, kitului *therascreen* KRAS PyroMark si DxS KRAS Mutation Kit, a arătat concordanță de 100% a rezultatelor.

Sensibilitatea diagnosticarii kitului *therascreen* KRAS PyroMark a fost de 100% si specificitatea diagnosticarii a fost de 100% (Tabelul 13).

Tabel 13. Rezultatele probelor de tumora canceroasa colorectala, analizate prospectiv, pentru codonii 12 si 13

		DxS KRAS Mutation Kit			
		Mutant	Tip salbatic	Necunoscut	Total
<i>therascreen</i> KRAS Pyro Kit	Mutant	33	0	1	34
	Tip salbatic	0	57	3	60
	Necunoscut	0	1	5	6
	Total	33	58	9	100

Analiza codonului 61

Aceiasi 100 de probe au fost analizate pentru mutatiile in codonul 61, folosind kitul *therascreen* KRAS PyroMark. Numai o singura proba a dat o valoare gresita a calitatii pentru testul codonului 61. Aceasta proba a dat de asemenea valori gresite la cele doua teste *therascreen* KRAS PyroMark si DxS pentru codonii 12 si 13, indicand faptul ca ADN-ul a fost de o calitate prea slaba. Rata de succes mai mare pentru testul codonului 61 indica faptul ca acesta este mai putin dependent de calitatea ADN-ului decat cele doua teste cu *therascreen* KRAS PyroMark si metoda DxS pentru codonii 12 si 13. Deoarece metoda DxS nu face analize pentru mutatiile din codonul 61, nu este posibila nici o comparatie directa a testelor.

Mutatiile din codonul 61 au fost detectate in 4 din cele 99 probe. Trei dintre ele continueau mutatii frecvente (CAC, CAT, CTA) in codonul 61, in timp de a patra proba continea mutatii in codonii 60 (GGT→GGA) si 61 (CAA→AAA).

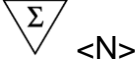












Nota: In toate testarile pentru determinarea caracteristicilor de performanta, semnalul a fost peste 60 RLU, obtinut in mod obisnuit din 10 ng de ADN izolat din tesut fixat in formol si parafinat (FFPE).

Referinte

QIAGEN pastreaza online o baza de date larga si actualizata, despre publicatiile stiintifice care utilizeaza produse QIAGEN. Optiunile de cautare vaste va permit sa gasiti articolele de care aveti nevoie, fie printr-o simpla cautare de cuvinte cheie fie prin specificarea aplicarii, zonei de cercetare, titlului, etc.

Pentru o lista de referinte completa, vizitati Baza de Date de Referinta QIAGEN, pe www.qiagen.com/RefDB/search.asp sau contactati Serviciile Tehnice QIAGEN sau distribuitorul dvs. local.

Simboluri

	Contine reactivi suficieni pentru <N> teste
	Se foloseste de catre
	Aparatura medicala pentru diagnostic in vitro
	Numar catalog
	Numar lot
	Numar material
	Componente
	Continut
	Numar
	Numărul global de articol comercial (GTIN)
	Limitari de temperatura
	Producator
	Vezi informatiile din manual

Informatii contact

Pentru asistență tehnică și mai multe informații, vă rugăm să consultați Centrul nostru de asistență tehnică la www.qiagen.com/Support sau sunati la unul din departamente de servicii tehnice Qiagen sau la distribuitorii locali (a se vedea coperta spate sau vizitați www.qiagen.com).

Anexa A: Setarea testarii *therascreen* KRAS Pyro


În cazul în care Reportul KRAS Plug-in a fost instalat, setările predefinite pentru codonii 12 și 13 și codonul 61 sunt disponibile în browser-ul de comenzi rapide din soft-ul PyroMark Q24 sub fisierul „Example file/PyroMark Setups/KRAS”. Următorii pași nu trebuie efectuați. Reportul Plug-in-KRAS poate fi obținut pe e-mail, de la pyro.plugin@qiagen.com.

Vă recomandăm utilizarea Raportului KRAS Plug-in față de analiză manuală. După instalarea plug-in sau de fiecare dată când un nou soft este instalat sau actualizat pe computerul, funcționarea corectă a plug-in-ului trebuie să fie verificată după cum este descris în Ghidul Plug-In.

În cazul în care Reportul KRAS Plug-in nu a fost instalat, fisierul testării trebuie să fie setat manual înainte de a rula testul *therascreen* KRAS Pyro pentru prima dată, așa cum este descris mai jos. Se setează testarea KRAS pentru codonii 12 și 13, și codonul KRAS 61 folosind soft-ul PyroMark Q24 așa cum este descris mai jos.

Protocol

Codonii KRAS 12 și 13

1. Click  în meniul din toolbar și selectați “New AQ Assay”.
2. Se introduce următoarea secvență în “Sequence to Analyze”.
GNTGRCGTAGGC

Nota: Mutațiile cele mai frecvente în codonul 12 vor fi detectate în nucleotida 35 (a doua poziție), folosind “sequence to Analyze”. Pentru a analiza dacă mutațiile sunt prezente în nucleotida 34 (prima poziție), se schimbă “Sequence to Analyze” la următoarea secvență:

NGTGRCGTAGGC

Nota: A se asigura că threshold-ul pentru un peak individual este setat la 30 RLU.

3. Se introduce manual următoarea “Dispensation Order”.
TACGACTCAGATCGTAG

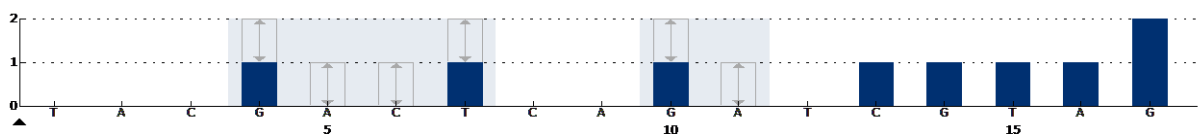


Figura 13. Histograma pentru codonii 12 (nucleotida 35) și 13 (nucleotida 38) cu “Sequence to Analyze” **GNTGRCGTAGGC**.

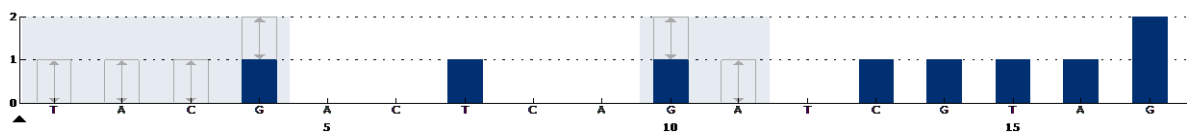


Figura 14. Histograma pentru codonii 12 (nucleotida 34) si 13 (nucleotida 38) cu “Sequence to analyze” *NGTGRCGTAGGC*.

4. Dati click pe “Analysis Parameters” si mariti “Peak Height Threshold” – Required peak height for Passed quality” la 30.
5. Dati click pe  din toolbar si salvati testul ca si “KRAScodon12+13”.

Codonul KRAS 61

6. Click  in toolbar si selectati “New AQ Assay”.
7. Introduceți următoarea secvența in “Sequence to Analyze”.
CTCDTGACCTG

Nota: Mutații cele mai frecvente în codonul 61 vor fi detectate in nucleotida 183 (pozitia a treia), cu aceasta secvență pentru analiza. Pentru a analiza dacă mutațiile sunt prezente in nucleotide 182 (pozitia a doua), schimba” Sequence to Analyze” la următoarea secvența.

CTCTHGACCTG

Pentru a analiza daca mutatiile sunt prezente in nucleotida 181 (prima pozitie), se schimba “Sequence to Analyze” la următoarea secvența.

CTCTTSACCTG

Nota: A se asigura ca threshold-ul pentru un peak individual este setata la 30 RLU.

8. Se adauga manual urmatoarele “Dispensation Order”.
GCTCAGTCAGACT

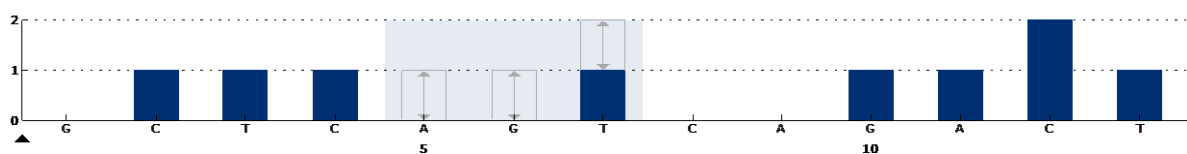


Figura 15. Histograma pentru codonul 61 (nucleotida 183) cu “Sequence to Analyze” *CTCDTGACCTG*.

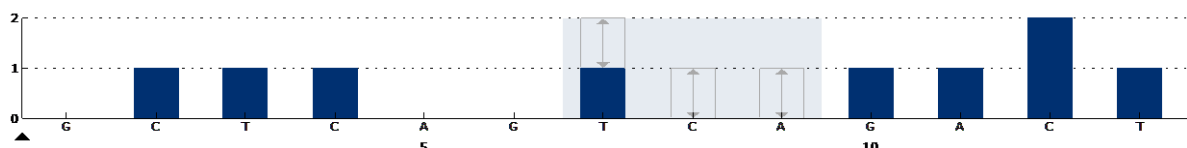


Figura 16. Histograma pentru codonul 61 (nucleotida 182) cu “Sequence to Analyze” *CTCTHGACCTG*.

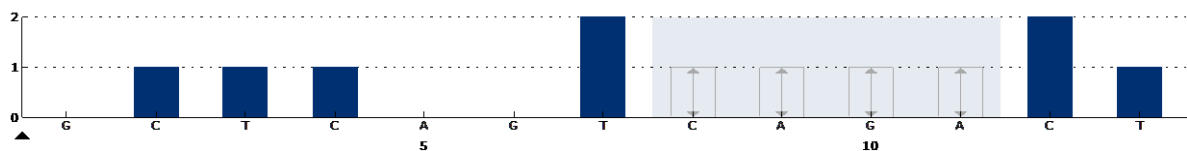



Figura 17. Histograma pentru codonul 61 (nucleotida 182) cu “Sequence to Analyze” *CTCTTSACCTG*.

9. Se da click pe “Analysis Parameters”, si se creste “Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:” la 30.
10. Click  in meniul de bare, si se salveaza testarea ca si “KRAScodon 61”.

Anexa B: Golirea compartimentului si jgheaburilor pentru deseuri

ATENTIUNE 	Substante chimice periculoase <p>Solutia de denaturare folosita pe statia de lucru in vid contine hidroxid de sodiu, care irita ochii si pielea.</p> <p>Se vor purta intotdeauna manusi de protectie, ochelari de protectie si un halat de laborator.</p> <p>Organul responsabil (ex. Directorul laboratorului) trebuie sa ia masurile de precautie necesare pentru a se asigura ca spatiul de lucru inconjurator este sigur si ca operatorii instrumentului nu sunt expusi unor nivele periculoase ale substantelor toxice (chimice sau biologice) asa cum sunt definite in Fisele Tehnice de Securitate (SDS-uri) aplicabile sau documentele OSHA, * ACGIH, † sau COSHH ‡</p> <p>Sistemul de ventilare pentru fum si aruncarea deseurilor trebuie sa corespunda tuturor regulamentelor si legilor nationale, statale si locale privind sanatatea si siguranta.</p>
---	--

* OSHA : Administratia de Siguranta si Sanatate Ocupationala (SUA)

† ACGIH: Conferinta Igienistilor Industriali Guvernamentali din America (SUA)

‡COSHH : Controlul substantelor periculoase pentru sanatate (Marea Britanie).

Asigurati-va ca sunt respectate regulamentele federale, statale si locale de mediu pentru aruncarea deseurilor de laborator.

Punct important inainte de pornire

- Acest protocol necesita apa de inalta puritate (Milli-Q 18.2 MΩ x cm, www.millipore.com, sau echivalentul).

Protocol

- 1. Asigurati-va ca nu se aplica vid asupra instrumentului de vid. Asigurati-va ca vidul este inchis (Off) si pompa de vid este oprita.**
- 2. Aruncati orice solutii lasate in jheaburi.**
- 3. Clatiti jgheaburile cu apa de inalta puritate, sau inlocuiti-le daca este cazul**
- 4. Goliti containerul pentru deseuri.**
Nota: Capacul poate fi scos fara deconectarea tuburilor.
- 5. Daca statia de lucru in vid trebuie curatata (de exemplu, datorita prafului sau scurgerilor) trebuie respectate instructiunile din Manualul Utilizatorului PyroMark Q24.**

Informatii pentru comanda

Produsul	Continutul	Cat. Nr.
<i>therascreen</i> KRAS Pyro Kit (24)	Pentru 24 de reactii pe sistemul PyroMark Q24 : Seq Primers, PCR Primers, Unmethylated Control DNA, PyroMark PCR Master Mix, CoralLoad Concentrate, PyroMark Binding Buffer, PyroMark Annealing Buffer, PyroMark Denaturation Solution, PyroMark Wash Buffer, Enzyme Mixture, Substrate Mixture, dATP α S, dCTP, dGTP, dTTP, and H ₂ O	971460
PyroMark Q24 MDx	Platforma detectare pe baza secventierii pentru Pirosecventierea a 24 de probe in paralel	9001513
PyroMark Q24	Platforma detectare pe baza secventierii pentru Pirosecventierea a 24 de probe in paralel	9001514
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation*	Statia de lucru in vid (220V) pentru pregatirea a 24 probe in paralel, de la produsul PCR la template-ul monocatenar	9001517* 9001515 [†]
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Statia de lucru in vid (220V) pentru pregatirea a 24 probe in paralel, de la produsul PCR la template-ul monocatenar	9001518
PyroMark Q24 MDx Software	Soft pentru aplicare	9019063
PyroMark Q24 Software	Soft pentru analiza	9019062
Accesorii		
PyroMark Q24 Plate (100)	Placuta de 24-godeuri pentru reactia de secventiere	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Cartuse pentru repartizarea nucleotidelor si reactivilor	979302

* doar in Marea Britanie.

[†] Restul lumii.

Produsul	Continutul	Cat. Nr.
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Sonde cu filtru re folosibile pentru PyroMark Vacuum Workstation Q96 si Q24	979010
PyroMark Control Oligo	Pentru verificarea instalarii sistemului	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	Pentru confirmarea performantei sistemului	979304
Produse conexe		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Pentru 50 probe ADN: 50 QIAamp MinElute [®] Columns, Proteinase K, Buffers, Collection Tubes (2 ml)	56404
EZ1 DNA Tissue Kit (48)	Pentru 48 de probe: Reagent Cartridges (Tissue), Disposable Filter-Tips, Disposable Tip-Holders, Sample Tubes (2 ml), Elution Tubes (1.5 ml), Buffer G2, Proteinase K	953034
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	Pentru 50 de probe: QIAamp Mini Spin Columns, Buffers, Reagents, Tubes, VacConnectors	61104

Pentru informatii referitoare la actualizarea licentei si pentru nerecunoasterile specifice produsului, vezi manualul respectiv al kitului QIAGEN sau manualul utilizatorului. Manualele kitului QIAGEN si manualele utilizatorului sunt disponibile pe www.qiagen.com sau pot fi cerute de la Serviciile Tehnice QIAGEN sau de la distribuitorul dvs. local.

Pentru tarile in care se aplica:

CUMPARAREA ACESTUI PRODUS PERMITE CUMPARATORULUI UTILIZAREA PENTRU PERFORMANTA IN CADRUL SERVICIILOR DE DIAGNOSTIC IN VITRO LA OAMENI. NU SE ACORDA ALTE DREPTURI GENERALE SAU LICENTE IN AFARA DE CELE ACORDATE PRIN CUMPARAREA ACESTUI PRODUS.

Marci inregistrate: QIAGEN[®], QIAamp[®], QIAxcel[®], BioRobot[®], CoralLoad[®], EZ1[®], HotStarTaq[®], MinElute[®], Pyro[®], Pyrogram[®], PyroMark[®], Pyrosequencing[®], *therascreen*[®] (QIAGEN Group); ABI PRISM[®] (Life Technologies Corporation); Analyse-it[®] (Analyse-it Software, Ltd.); Milli-Q[®] (Millipore Corporation); Sepharose[®] (GE Healthcare); Variomag[®] (Florida Scientific Services, Inc.); Windows[®] (Microsoft Corporation).

Acord de licenta limitat

Folosirea acestui produs prevede acordul oricarui furnizor sau utilizator al kitului PyroMark KRAS pentru urmatoorii termeni:

1. Kitul PyroMark KRAS poate fi utilizat numai in conformitate cu Manualul Kitului PyroMark KRAS si numai cu componentele continute in kit (trusa). Sub protectia proprietatii intelectuale, QIAGEN nu acorda nicio licenta pentru folosirea sau incorporarea componentelor incluse in acest kit cu alte componente neincluse in acest kit, cu exceptia celor descrise in Manualul pentru kitul PyroMark KRAS si protocoalele aditionale disponibile pe www.qiagen.com.
2. Pentru alte licente decat cele declarate expres, QIAGEN nu da nici o garantie a faptului ca acest kit (trusa) si/sau utilizarea sa nu incalca drepturile tertilor.
3. Acest kit (trusa) si componentele sale sunt brevetate pentru o singura utilizare si nu pot fi refolosite, renovate sau revandute.
4. QIAGEN isi declina in mod specific, expres si implicit orice alte licente decat cele declarate in mod expres.
5. Furnizorii si utilizatorii kitului sunt de acord sa nu faca sau sa permita altcuiva sa faca niciun pas care ar putea conduce sau facilita acte interzise mai sus. QIAGEN poate impune interdictiile din acest Acord de Licenta Limitat, in orice instanta si va recupera cheltuielile pentru investigatiile sale si cheltuielile de judecata, inclusiv onorariile avocatilor, din orice actiune de impunere a acestui Acord de Licenta Limitata sau oricare din drepturile sale de proprietate intelectuala legate de acest kit si/sau componentele sale.

Pentru termeni actualizati ai licentei, vezi www.qiagen.com.

© 2015 QIAGEN, ne rezervam toate drepturile

www.qiagen.com

Australia ■ Orders 1-800-243-800 ■ Fax 03-9840-9888 ■ Technical 1-800-243-066

Austria ■ Orders 0800-28-10-10 ■ Fax 0800-28-10-19 ■ Technical 0800-28-10-11

Belgium ■ Orders 0800-79612 ■ Fax 0800-79611 ■ Technical 0800-79556

Brazil ■ Orders 0800-557779 ■ Fax 55-11-5079-4001 ■ Technical 0800-557779

Canada ■ Orders 800-572-9613 ■ Fax 800-713-5951 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

China ■ Orders 86-21-3865-3865 ■ Fax 86-21-3865-3965 ■ Technical 800-988-0325

Denmark ■ Orders 80-885945 ■ Fax 80-885944 ■ Technical 80-885942

Finland ■ Orders 0800-914416 ■ Fax 0800-914415 ■ Technical 0800-914413

France ■ Orders 01-60-920-926 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Technical 01-60-920-930 ■ Offers 01-60-920-928

Germany ■ Orders 02103-29-12000 ■ Fax 02103-29-22000 ■ Technical 02103-29-12400

Hong Kong ■ Orders 800 933 965 ■ Fax 800 930 439 ■ Technical 800 930 425

Ireland ■ Orders 1800 555 049 ■ Fax 1800 555 048 ■ Technical 1800 555 061

Italy ■ Orders 800-789-544 ■ Fax 02-334304-826 ■ Technical 800-787980

Japan ■ Telephone 03-6890-7300 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Technical 03-6890-7300

Korea (South) ■ Orders 080-000-7146 ■ Fax 02-2626-5703 ■ Technical 080-000-7145

Luxembourg ■ Orders 8002-2076 ■ Fax 8002-2073 ■ Technical 8002-2067

Mexico ■ Orders 01-800-7742-639 ■ Fax 01-800-1122-330 ■ Technical 01-800-7742-436

The Netherlands ■ Orders 0800-0229592 ■ Fax 0800-0229593 ■ Technical 0800-0229602

Norway ■ Orders 800-18859 ■ Fax 800-18817 ■ Technical 800-18712

Singapore ■ Orders 1800-742-4362 ■ Fax 65-6854-8184 ■ Technical 1800-742-4368

Spain ■ Orders 91-630-7050 ■ Fax 91-630-5145 ■ Technical 91-630-7050

Sweden ■ Orders 020-790282 ■ Fax 020-790582 ■ Technical 020-798328

Switzerland ■ Orders 055-254-22-11 ■ Fax 055-254-22-13 ■ Technical 055-254-22-12

UK ■ Orders 01293-422-911 ■ Fax 01293-422-922 ■ Technical 01293-422-999

USA ■ Orders 800-426-8157 ■ Fax 800-718-2056 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

